

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 15.05.00.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 16.11.01 Bulletin 01/46.

56 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71 Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement
public à caractère scientifique et technologique — FR.

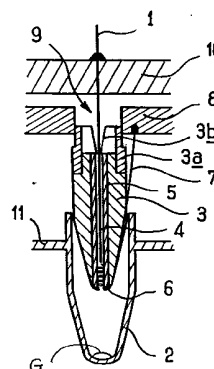
72 Inventeur(s) : GAUGUET GILBERT et SIEBERT RAI-
NER.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

54 PROCÉDE ET DISPOSITIF POUR L'INJECTION D'UN ECHANTILLON DANS UN CAPILLAIRE
D'ELECTROPHORESE.

57 Procédé pour l'injection d'un échantillon dans un ca-
pillaire d'électrophorèse selon lequel on plonge le capillaire
(1) dans l'échantillon et on applique entre les extrémités du
capillaire (1) un champ électrique pour faire migrer l'échan-
tillon dans le capillaire (1), caractérisé en ce qu'on introduit
préalablement l'échantillon dans une pièce (3) présentant
un canal (4) dont les dimensions, perpendiculairement à la
direction selon laquelle ledit canal (4) s'étend, sont inférieu-
res à environ quatre fois le diamètre extérieur du capillaire
(1), et en ce que pour plonger le capillaire (1) dans l'échan-
tillon, on introduit ledit capillaire (1) dans ledit canal (4).



PROCEDE ET DISPOSITIF POUR L'INJECTION D'UN ECHANTILLON DANS UN CAPILLAIRE D'ELECTROPHORESE

La présente invention est relative à l'injection d'un échantillon dans
5 un capillaire d'électrophorèse.

L'électrophorèse par capillaire(s) a l'avantage de permettre un plus grand débit et une automatisation plus élevée que les techniques d'électrophorèse antérieures.

Toutefois, cette technique s'avère très coûteuse en particulier quant
10 à la préparation des échantillons.

Les techniques d'injection principalement utilisées à ce jour nécessitent en effet des préparations de grandes quantités de volume d'échantillons (10 à 20 μ l d'échantillon d'ADN par exemple), dont elles n'utilisent qu'une faible partie.

15 Un but de l'invention est de pallier cet inconvénient.

Un autre but de l'invention est de proposer une technique qui permette de réaliser, dans un capillaire ou un ensemble de capillaires, une injection électrocinétique reproductible et efficace.

On connaît principalement deux méthodes différentes pour injecter
20 un échantillon, tel que par exemple un échantillon d'ADN, dans un capillaire : l'injection hydrodynamique, et l'injection électrocinétique.

L'injection hydrodynamique consiste à utiliser une différence de pression pour faire entrer une certaine quantité d'échantillon dans un capillaire. Cette technique est souvent peu satisfaisante, dans la mesure où
25 elle nécessite des zones d'introduction d'échantillons larges et ne permet par conséquent pas une bonne résolution, où elle ne peut être utilisée que pour des matrices de séparation peu visqueuses et où elle est difficile à mettre en œuvre en parallèle sur une pluralité de capillaires.

C'est pourquoi on privilégie le plus souvent l'injection
30 électrocinétique, qui consiste à appliquer, pendant une courte durée, une différence de potentiel entre les extrémités des capillaires pour faire migrer les molécules à l'intérieur de ceux-ci. La quantité d'échantillon introduite par cette méthode peut être augmentée, soit en accentuant la différence de

potentiel, soit en allongeant le temps de chargement, sans pour autant maîtriser totalement la quantité injectée. En général, la résolution est meilleure que pour l'injection hydrodynamique.

L'invention propose quant à elle un procédé pour l'injection d'un
5 échantillon dans un capillaire d'électrophorèse selon lequel on plonge le capillaire dans l'échantillon et on applique entre les extrémités du capillaire un champ électrique pour faire migrer l'échantillon dans le capillaire, caractérisé en ce qu'on introduit préalablement l'échantillon dans une pièce
10 présentant un canal dont les dimensions, perpendiculairement à la direction selon laquelle ledit canal s'étend, sont inférieures à environ quatre fois le diamètre extérieur du capillaire, et en ce que pour plonger le capillaire dans l'échantillon, on introduit ledit capillaire dans ledit canal.

Elle propose également un dispositif pour l'injection d'un échantillon dans un capillaire d'électrophorèse comportant une pièce creuse dans
15 laquelle l'échantillon est reçu et dans laquelle le capillaire est destiné à être plongé, ainsi que des moyens pour appliquer entre les extrémités du capillaire un champ électrique destiné à faire migrer l'échantillon dans le capillaire, caractérisé en ce que ladite pièce creuse est une pièce présentant un canal dont les dimensions, perpendiculairement à la direction
20 selon laquelle ledit canal s'étend, sont inférieures à environ quatre fois le diamètre extérieur du capillaire et qui est apte à recevoir un capillaire et en ce qu'il comporte en outre des moyens pour introduire l'échantillon dans ledit canal.

Avec un tel procédé ou un tel dispositif, on restreint
25 considérablement le volume d'échantillon qu'il est nécessaire de préparer : il suffit en effet d'un volume d'échantillon permettant de remplir le canal sur quelques millimètres ; l'ensemble de l'échantillon préparé est alors utilisé.

Par ailleurs, un tel canal permet de parfaitement contrôler la position du capillaire et en particulier de le positionner avec une grande
30 précision par rapport à l'électrode et créer ainsi d'une manière reproductible un champ électrique destiné à faire migrer l'échantillon.

En outre, il permet une grande homogénéité sur le champ en entrée du capillaire, et donc une même vitesse de migration sur l'ensemble des molécules dans le canal.

On améliore ainsi la reproductibilité et l'efficacité de l'injection.

5 Le dispositif d'injection proposé par l'invention est avantageusement complété par les différentes caractéristiques suivantes prises seules ou selon toutes leurs combinaisons possibles, qui contribuent également à atteindre les buts de l'invention :

- l'élément formant puits et la pièce qui présente le canal sont aptes à
10 s'emboîter l'un dans l'autre, l'échantillon montant par capillarité ou différence de pression dans le canal lorsque la pièce qui présente le canal est introduite dans la pièce formant puits ;
- l'élément formant puits présente une forme évasée facilitant le guidage de la pièce qui présente un canal ;
- 15 - le canal se prolonge par une ouverture évasée qui facilite l'introduction du capillaire ;
- cette ouverture est sensiblement de forme conique;
- le dispositif comporte une plaque qui présente une pluralité d'éléments formant puits destinés à coopérer avec une pluralité de pièces
20 complémentaires présentant chacune un canal ;
- le dispositif comporte au moins un réceptacle apte à recevoir une telle plaque et des moyens aptes à transporter automatiquement ledit réceptacle d'une station de travail à une autre ;
- le dispositif comporte en outre un couvercle apte à fermer le réceptacle
25 lorsqu'une telle plaque est en place dans celui-ci ;
- le dispositif comporte des moyens formant joint assurant l'étanchéité entre le réceptacle et le couvercle ;
- les pièces complémentaires présentant chacune un canal sont portées par une plaque et le dispositif comporte des moyens pour positionner
30 automatiquement l'une par rapport à l'autre ladite plaque et la plaque qui présente une pluralité d'éléments formant puits.

L'invention porte également sur un dispositif d'électrophorèse comportant un tel dispositif d'injection.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront encore de la description qui suit qui est purement illustrative et non limitative et qui doit être lue en regard des dessins annexés sur lesquels :

- la figure 1 est une représentation schématique en coupe d'un
5 dispositif conforme à un mode de réalisation possible de l'invention ;

- la figure 2 est une représentation schématique en perspective éclatée d'une palette de manipulation d'un dispositif conforme à un mode de réalisation de l'invention ;

- la figure 3 est une représentation schématique en perspective
10 d'une enceinte de stockage d'un dispositif conforme à un mode de réalisation possible de l'invention et de moyens de manipulation automatiques.

On a représenté sur la figure 1 un système permettant l'injection d'échantillons dans un capillaire 1.

15 Ce système comporte un puits 2 dont le fond est de forme sensiblement conique et reçoit une gouttelette d'un échantillon à injecter dans le capillaire. Il comporte en outre une pièce 3 destinée à être introduite dans ce puits 2 et qui est d'une forme lui permettant de s'emboîter dans celui-ci.

20 Cette pièce 3 présente un canal 4, en l'occurrence tubulaire, qui s'étend axialement sur toute sa longueur et dans lequel le capillaire 1 est reçu.

Plus exactement, ce canal 4 est défini par un tube 5 en verre ou en un matériau analogue qui est de très faible diamètre intérieur et dans lequel
25 le capillaire 1 est reçu.

La pièce 3 porte, à son extrémité par laquelle l'échantillon est destiné à s'introduire dans le tube 5, puis dans le capillaire 1, une électrode 6.

L'alimentation de cette électrode 6 est réalisée au moyen d'un fil
30 métallique 7 qui s'étend dans la hauteur de la pièce 3 entre ladite électrode 6 et une plaque métallique 8 qui est elle-même reliée à un générateur Haute Tension.

La pièce 3 est fixée dans un orifice 9 qui traverse la plaque 8, par exemple par vissage.

Cette pièce 3 se termine au niveau dudit orifice 9 par une portion 3a métallique (conducteur électrique), qui est traversée par une ouverture axiale 3b de forme conique qui permet de guider le capillaire pour le placer dans le tube 5 (les parois de cette ouverture sont par exemple en Téflon).

Le capillaire 1 est quant à lui porté par une plaque 10 formant support.

Une injection au moyen du dispositif qui vient d'être décrit s'effectue de la façon suivante.

On dispose au fond du puits 2 une goutte G d'échantillon (c'est à dire quelques μl , par exemple de 1 à 5), puis on introduit la pièce 3 dans le puits 2.

La goutte G monte alors par capillarité ou pression dans le tube 5. Une goutte de quelques micro- litres d'échantillon suffit pour créer ainsi dans le tube 5 une colonne de plusieurs mm d'échantillon.

On introduit alors le capillaire 1 dans la pièce 3 en rapportant la plaque 10 formant support sur la plaque 8.

Le capillaire 1 baigne alors dans l'échantillon, en étant situé à une distance bien déterminée et reproductible de l'électrode 6.

L'application d'un champ électrique entre l'électrode 6 et une autre électrode - non représentée - à l'extrémité du capillaire 1 la plus éloignée de l'électrode 6 permet de faire migrer les molécules dans le capillaire 1.

Le capillaire 1 est par exemple d'une longueur de 35 cm, d'un diamètre interne de 75 μm et d'un diamètre externe de 200 μm .

La pièce 3 et la plaque 10 sont par exemple en Plexiglas.

Le puits 2, la pièce 3 et le tube 5 sont par exemple d'une hauteur de 20 à 25 mm.

La plaque 8 est par exemple en Inox.

Le tube 5 présente par exemple un diamètre interne de 650 μm et un diamètre externe de 1600 μm .

Le diamètre interne du trou conique que présente la portion 3 en Téflon varie de 1000 μm à 400 μm .

L'électrode 6 est par exemple en Platine et se présente sous la forme d'un disque d'un diamètre interne de 400 μm et d'un diamètre externe
5 de 700 μm , rapporté sur la tranche d'extrémité de la pièce 3.

Bien entendu, d'autres dispositions d'électrodes pourraient être envisagées.

Notamment, l'électrode 6 pourrait être portée par le fond du puits 2. Elle pourrait être constituée par un fil par exemple en Platine qui descend
10 de la plaque 8 jusqu'au fond du puits. Le tube 5 peut être en Platine et jouer le rôle d'électrode.

En variante encore, la pièce 2 pourrait être une pièce métallique constituant l'électrode 6.

Dans tous les cas, il est avantageux de donner à l'électrode une
15 géométrie permettant un champ électrique aussi homogène que possible dans le canal 4.

Le puits 2 est avantageusement porté par une plaque 11, avec une pluralité d'autres puits d'injection.

A titre d'exemple, la plaque 11 peut porter 96 puits répartis selon
20 une matrice 8 * 12.

Ainsi que l'illustre la figure 2, cette plaque 11 et les puits 2 qu'elle porte sont avantageusement reçus dans un réceptacle 12.

Ce réceptacle 12 permet de manipuler lesdites plaques 11 et en particulier de les transporter d'une station de travail à une autre.

25 Il comporte des moyens de détrompage (picots 17) imposant une seule position possible pour une plaque 11 dans ledit réceptacle 12.

Un couvercle 13 est rapporté sur ledit réceptacle 12 pour éviter l'évaporation et l'exposition à la lumière des échantillons.

Des moyens formant joint sont prévus entre ledit couvercle 13 et
30 ledit réceptacle 12 pour réduire au minimum l'évaporation.

Les palettes 14 ainsi constituées par un réceptacle 12 fermé par un couvercle 13 et renfermant une plaque 11 permettent à un automate de manipuler les plaques 11 de la façon suivante.

Les puits 2 de la plaque 11 ayant été initialement remplis,
5 l'automate ou un opérateur positionne un couvercle 13 sur le réceptacle 12 dans lequel ladite plaque 11 est disposée de façon à fermer le réceptacle 12.

Puis, la palette 14 ainsi constituée est transportée jusqu'à une enceinte 15 (figure 3), dans laquelle il est possible de stocker un grand
10 nombre de ces palettes 14.

L'armoire 15 comporte par exemple un compartiment réfrigéré maintenu en permanence à 4°C ou en dessous, ce qui permet de minimiser la dégradation des échantillons stockés.

Le dispositif peut par ailleurs également comporter un compartiment
15 de chauffage permettant de dénaturer les échantillons, par exemple en les chauffant à 95°C, avant de les refroidir rapidement à 4°C ou en dessous, l'automate déplaçant les palettes 14 d'un compartiment à un autre.

Le compartiment de chauffage peut être intégré à l'armoire 15, ou être constitué par une station de travail indépendante.

20 Lorsqu'une électrophorèse doit être mise en œuvre sur une plaque 11, l'automate va chercher dans le compartiment réfrigéré de l'armoire 15 la palette qui correspond à cette plaque 11, au moyen d'un bras de manipulation 16.

Il lui retire son couvercle 13 et le remplace par un couvercle
25 constitué par une plaque du type de la plaque 8, porteuse d'une pluralité de pièces 3 supports d'électrodes, ces pièces 3 étant réparties sur ladite pièce 8 de façon à correspondre aux différents puits 2 de la plaque 11.

Les échantillons montent alors par capillarité dans les tubes 5 des pièces 3.

30 Lorsque les échantillons sont ainsi en place dans les tubes 5, la nouvelle palette – constituée par un réceptacle 12, une plaque 11 et un couvercle 8 porteur d'une pluralité de pièces 3 supports d'électrodes – est transportée par l'automate dans le séquenceur.

Elle y est insérée selon un mouvement parallèle à l'axe des capillaires, lesquels s'introduisent dans les tubes 5 des pièces 3 en étant guidés par les ouvertures coniques des portions 3a.

Tous les capillaires se trouvent alors positionnés de la même façon
5 par rapport aux électrodes 6 et ce positionnement est reproductible d'une plaque 11 à une autre.

REVENDECATIONS

1. Procédé pour l'injection d'un échantillon dans un capillaire d'électrophorèse selon lequel on plonge le capillaire (1) dans l'échantillon et
5 on applique entre les extrémités du capillaire (1) un champ électrique pour faire migrer l'échantillon dans le capillaire (1), caractérisé en ce qu'on introduit préalablement l'échantillon dans une pièce (3) présentant un canal (4) dont les dimensions, perpendiculairement à la direction selon laquelle
10 ledit canal (4) s'étend, sont inférieures à environ quatre fois le diamètre extérieur du capillaire (1), et en ce que pour plonger le capillaire (1) dans l'échantillon, on introduit ledit capillaire (1) dans ledit canal (4).

2. Dispositif pour l'injection d'un échantillon dans un capillaire (1) d'électrophorèse comportant une pièce (3) creuse dans laquelle l'échantillon est reçu et dans laquelle le capillaire (1) est destiné à être plongé, ainsi que
15 des moyens pour appliquer entre les extrémités du capillaire (1) un champ électrique destiné à faire migrer l'échantillon dans le capillaire (1), caractérisé en ce que ladite pièce (3) creuse est une pièce présentant un canal (4) dont les dimensions, perpendiculairement à la direction selon laquelle ledit canal (4) s'étend, sont inférieures à environ quatre fois le
20 diamètre extérieur du capillaire (1) et qui est apte à recevoir un capillaire (1) et en ce qu'il comporte en outre des moyens pour introduire l'échantillon dans ledit canal (4).

3. Dispositif selon la revendication 2, caractérisé en ce que les moyens pour introduire un échantillon dans le canal (4) comportent un
25 élément formant puits qui est apte à recevoir la pièce(3) qui présente le canal (4) et dont le fond est destiné à recevoir une goutte d'échantillon.

4. Dispositif selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'élément formant puits et la pièce (3) qui présente le canal sont aptes à s'emboîter l'un dans l'autre, l'échantillon montant par capillarité ou différence de
30 pression dans le canal (4) lorsque la pièce (3) qui présente le canal (4) est introduite dans la pièce formant puits.

5. Dispositif selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'élément formant puits présente une forme évasée facilitant le guidage de la pièce (3) qui présente un canal (4).

6. Dispositif selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que le canal se prolonge par une ouverture évasée qui facilite l'introduction du capillaire.

7. Dispositif selon la revendication 6, caractérisé en ce que cette ouverture est sensiblement de forme conique.

8. Dispositif selon la revendication 3, prise seule ou en combinaison avec l'une des revendications 4 à 7, caractérisé en ce qu'il comporte une plaque qui présente une pluralité d'éléments formant puits destinés à coopérer avec une pluralité de pièces complémentaires présentant chacune un canal.

9. Dispositif selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un réceptacle apte à recevoir une telle plaque et des moyens aptes à transporter automatiquement ledit réceptacle d'une station de travail à une autre.

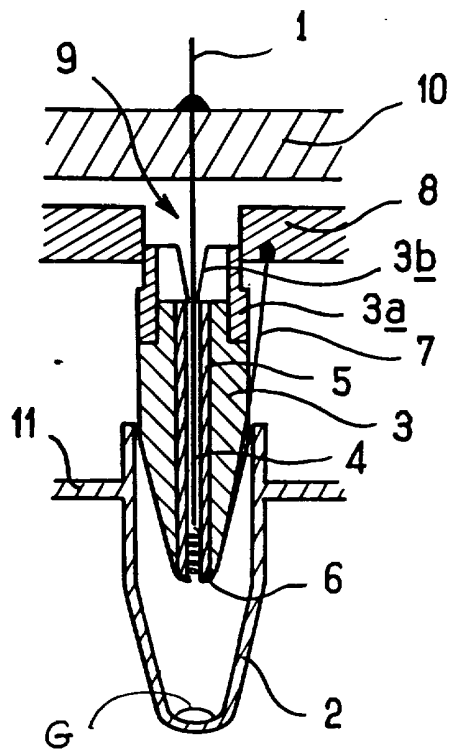
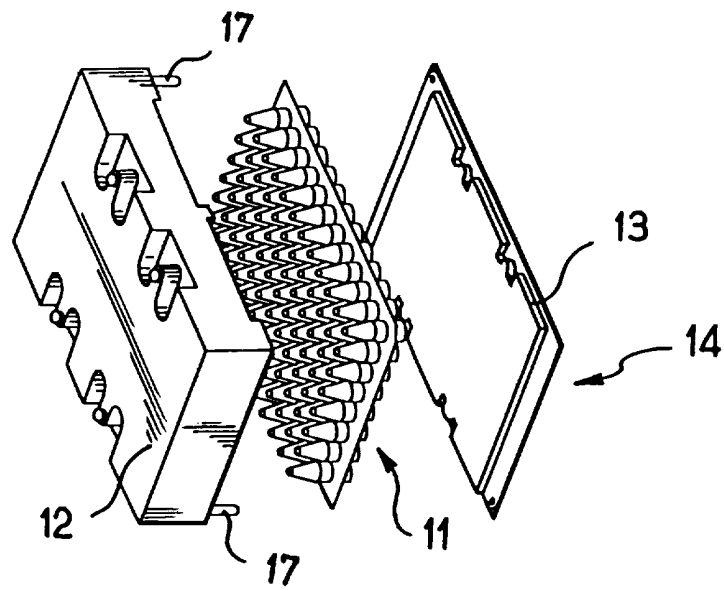
10. Dispositif selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comporte en outre un couvercle apte à fermer le réceptacle lorsqu'une telle plaque est en place dans celui-ci.

11. Dispositif selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comporte des moyens formant joint assurant l'étanchéité entre le réceptacle et le couvercle.

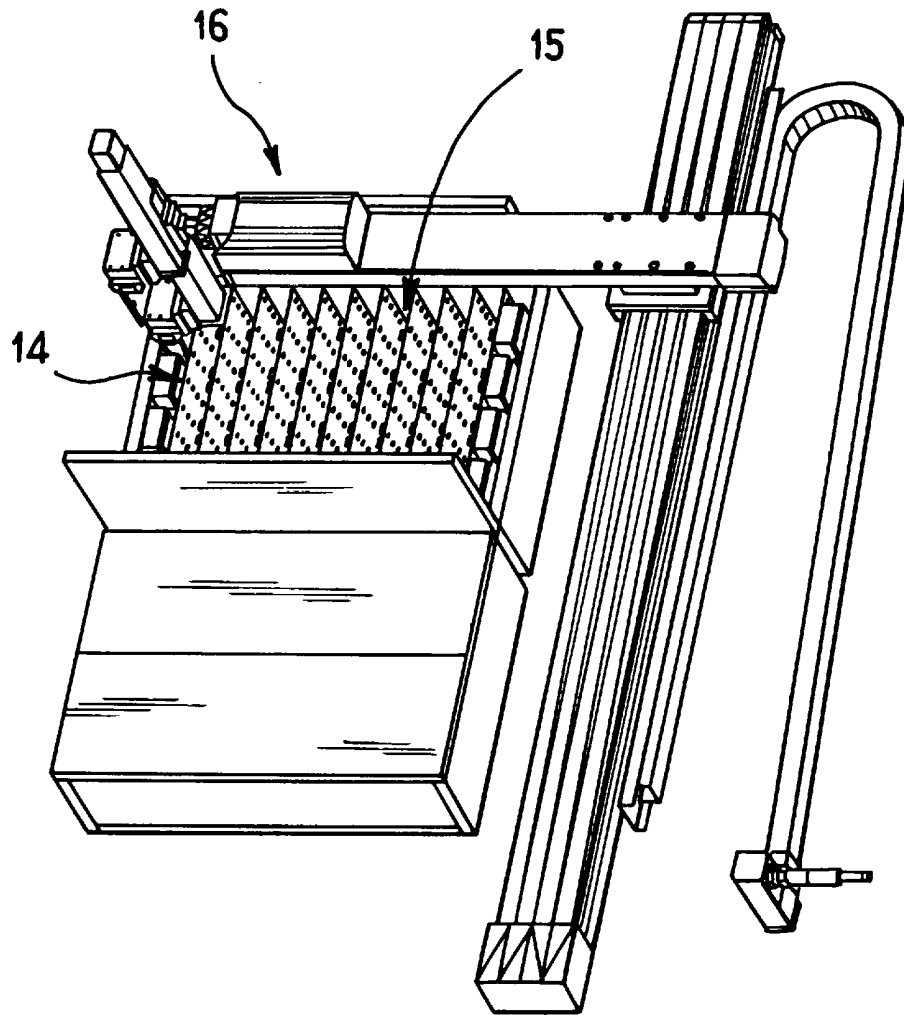
12. Dispositif selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que les pièces complémentaires présentant chacune un canal sont portées par une plaque et en ce qu'il comporte des moyens pour positionner automatiquement l'une par rapport à l'autre ladite plaque et la plaque qui présente une pluralité d'éléments formant puits.

13. Dispositif d'électrophorèse caractérisé en ce qu'il comporte un dispositif d'injection selon l'une des revendications 2 à 12.

1 / 2

FIG. 1FIG. 2

2 / 2

FIG. 3



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 587973
FR 0006138

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	HONG-FENG YIN ET AL: "A MINIATURE DEVICE FOR ELECTROKINETIC OR HYDRODYNAMIC SAMPLE INTRODUCTION FROM SMALL VOLUMES IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS" JOURNAL OF HIGH RESOLUTION CHROMATOGRAPHY, DE, WILEY VCH, WEINHEIM, vol. 14, no. 4, 1 avril 1991 (1991-04-01), pages 282-284, XP000205060 ISSN: 0935-6304 * le document en entier *	1,2	G01N27/447 B01D57/02
A	EP 0 581 983 A (HEWLETT PACKARD GMBH) 9 février 1994 (1994-02-09) * colonne 9, ligne 6 - colonne 11, ligne 35; figures 4-6 *	1	
A	WO 00 16085 A (PERKIN ELMER CORP) 23 mars 2000 (2000-03-23) * le document en entier *	1	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
23 avril 2001		Duchatellier, M	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			